文章编号:1000-5404(2011)17-1783-06

论著

羧基末端结合蛋白 CtBP2 与泛素结合酶 UBE2 Ⅰ的相互作用

叶晓霞[1],石 彦[2],霍克克[2],陈 东[1],吴民华[1] (524023 广东 湛江,广东医学院基础医学院组织学与胚胎学教研室[1];200433 上海,复旦大学生命科学院遗传研究所[2])

[摘要] **目的** 筛选并确定人羧基末端结合蛋白 CtBP2 的相互作用蛋白。**方法** 用酵母双杂交技术,以人 CtBP2 为诱饵蛋白筛选人肝 cDNA 文库,获得与之相互作用的候选蛋白,采用酵母共转化和细胞免疫共沉淀实验确认相互作用的特异性,最后利用荧光蛋白融合表达技术和荧光显微镜观察确认 CtBP2 与其相互作用蛋白的亚细胞共定位情况。**结果** 酵母双杂交筛选获得了 41 个与 Bd-CtBP2 相互作用的阳性克隆,编码 10 个不同的蛋白,其中有 4 个克隆编码泛素结合酶 UBE2 Ⅰ的不同片段。从人肝 cDNA 文库中扩增获得 UBE2 Ⅰ的全长编码序列,酵母共转化和细胞免疫共沉淀实验证实 CtBP2 与 UBE2 Ⅰ能够特异性结合。亚细胞定位研究表明 GFP-CtBP2 弥散分布于细胞核,DsRed-UBE2 Ⅰ不均匀分布于细胞核,有部分点状聚集。两者共转染时能够呈点状共定位于细胞核。**结论** 人 CtBP2 能够在细胞核内与 UBE2 Ⅰ特异性相互作用,是 UBE2 Ⅰ的靶蛋白。

[关键词] 羧基末端结合蛋白;酵母双杂交;泛素结合酶 UBE2 Ⅰ;免疫共沉淀;亚细胞共定位
[中图法分类号] R394-33; R394.3 [文献标志码] A

Interaction between C-terminal binding protein 2 and ubiquitin-conjugating enzyme E2I

Ye Xiaoxia[1], Shi Yan[2], Huo Keke[2], Chen Dong[1], Wu Minhua[1] ([1]Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Science, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong Province, 524023; [2]Institute of Genetics, School of Life Science, Fudan University, Shanghai, 200433, China)

[**Abstract**] **Objective** To screen and identify the proteins that can interact with human C-terminal binding protein 2 (CtBP2). **Methods** Yeast two-hybrid screening technique, with CtBP2 as bait protein, was used to screen out the genes of the candidate CtBP2-interacting proteins from human liver cDNA library. Then, yeast co-transformation assay and co-immunoprecipitation assay were performed to confirm the specificity of interaction. Fluorescent fusion proteins and a fluorescence microscope were used for subcellular co-localization of CtBP2 and its interacting proteins in HeLa cells. **Results** The yeast two-hybrid screening method yielded 41 positive clones that coded 10 CtBP2-interacting proteins. Among them, 4 clones coded different fragments of ubiquitin-conjugating enzyme E2 Ⅰ (UBE2 Ⅰ). The full-length coding sequence of UBE2 Ⅰ was amplified from human liver cDNA library. The specific interaction between CtBP2 and UBE2 Ⅰ was confirmed by the yeast co-transformation assay and co-immunoprecipitation assay. The subcellular localization results showed that: (1) GFP-CtBP2 was dispersed in the nuclei of HeLa cells, (2) DsRed-UBE2 Ⅰ was unevenly distributed in the nuclei of HeLa cells with some spotty accumulation, and (3) GFP-CtBP2 and DsRed-UBE2 Ⅰ could be co-localized in nuclear speckles when the HeLa cells were transfected with both pEGFP-CtBP2 and pDsRed-UBE2 Ⅰ. **Conclusion** Human CtBP2 can interact with UBE2 Ⅰ specifically in the nucleus and is a target protein of UBE2 Ⅰ.

[**Key words**] human C-terminal binding protein 2; yeast two-hybrid; ubiquitin-conjugating enzyme E2 Ⅰ; co-immunoprecipitation; subcellular co-localization

Supported by the Medical Scientific Research Foundation of Department of Health of Guangdong Province (B2009192) and the Scientific Research Foundation of Guangdong Medical College (B2009010). Corresponding author: Ye Xiaoxia, Tel: 86-759-2388575, E-mail: yemissing@yahoo.com.cn

羧基末端结合蛋白(C-terminal binding protein, CtBP)因为能够与腺病毒蛋白 E1A 的羧基末端结合而得名[1]。CtBP 蛋白家族在细胞内发挥广泛的作用,在机体的正常发育、肿瘤的形成等过程中起着重要的作用[2-3]。已有研究表明,CtBP 蛋白在细胞核内主要作为转录辅助抑制子,调节多种靶基因的转录。此时,CtBP 蛋白能够与多种识别并结合特异 DNA 序列的转录因子结合形成转录复合物,然后募集各种染色质修饰酶,如组蛋白去甲基化酶 (lysine-specific demethy-

[基金项目] 广东省卫生厅医学科研基金(B2009192);广东医学院科研基金(B2009010)
[通信作者] 叶晓霞,电话:(0759)2388575,E-mail:yemissing@yahoo.com.cn

lase,LSD1)、去乙酰化酶(histone deacetylase,HDAC)、甲基转移酶(histone lysine methyltransferase,HMTase)等,最终抑制多个与胚胎发育、细胞分化和分裂、肿瘤发生相关基因的转录,影响细胞的黏附和凋亡、血管的形成、体节形成等[3-5]。而在细胞质中,CtBP蛋白可参与高尔基体分裂,与中心体密切相关,影响细胞有丝分裂等[6-7]。

CtBP蛋白家族在高等真核生物中高度保守,脊椎动物中有2个不同基因,分别编码2个相似蛋白CtBP1和CtBP2,哺乳动物中CtBP2还有一个不同的剪切本RIBEYE[4]。虽然这些蛋白的结构相似,但遗传和生化研究表明它们的功能并不完全相同或冗余。例如CtBP2定位于细胞核[8],而其另外的剪切本RIBEYE却只在细胞质中分布[9]。通过小鼠研究发现,mCtBP1的表达从胚胎期一直延续到成体,而mCtBP2则只在胚胎形成过程中表达[10]。基因敲除了mCtBP1的小鼠胚胎虽小但可存活,而敲除了mCtBP2的小鼠胚胎在妊娠中期就死亡,存在多个组织发育缺陷和轴中胚层的截断[11]。鸟的胚胎发育过程中基因表达模式研究也表明aCtBP1和aCtBP2在某些组织中均有表达,可能功能冗余,但在另外一些组织中则表达不同、功能唯一[12]。此外,还有研究暗示在小鼠胚胎中mCtBP2可能作为转录激活因子调节Brachyury基因的转录[10],这与传统的CtBP1作为转录辅助抑制因子的功能有着很大的区别。因此,对于CtBP2的功能及相关机制的研究还有待深入。本研究采用人CtBP2作为诱饵,利用酵母双杂交技术筛选人肝cDNA文库,发现和确认与之相互作用的蛋白,为深入探索CtBP2的功能和具体机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人CtBP2基因cDNA克隆购自武汉三鹰生物技术有限公司,酵母双杂交系统ProQuest™ two-hybrid system购自Invitrogen公司,人肝cDNA文库购自Clontech公司,细胞表达质粒pcDNA3.1-HisA购自Invitrogen公司,pCMV-Myc和荧光融合表达质粒pEGFP-C1、pDsRed-C1购自Clontech公司。DNA限制性内切酶、DNA连接酶Solution Ⅰ、DNA聚合酶Ex*Taq*、dNTP等购自TaKaRa公司,质粒抽提试剂盒、DNA纯化试剂盒购自上海博彩生物制剂公司,引物合成和质粒测序由上海英骏生物技术有限公司完成。DMEM高糖培养基、PBS、胎牛血清、胰酶等购自Gibco公司,阳离子脂质体Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,Protein A/G PLUS agarose购自Santa Cruz公司,鼠抗His、鼠抗Myc单抗购自BD Bioscience公司,HRP交联的羊抗鼠二抗购自Calbiochem公司,化学发光底物检测试剂盒(Super-Signal West Femto)购自Pierce公司。

1.2 质粒构建

在美国国立生物信息技术中心网站NCBI查询人类CtBP2基因(GeneID:1488)和UBE2Ⅰ基因(GeneID:7329)的mRNA序列CtBP2(Accession No. NM_001329)、UBE2Ⅰ(Accession No. NM_003345),根据基因开放阅读框信息和所连载体的需要,分别设计引物(表1),进行PCR扩增,所得PCR产物采用适当双酶切后回收。同时分别采用相应双酶切处理pDBLeu、pPC86、pcDNA3.1-His、pCMV-Myc、pEGFP-C1和pDsRed-C1载体,DNA凝胶电泳分离并割胶回收,所得载体片段分别与相应的PCR片段采用Solution Ⅰ连接。连接产物转化Top10大肠杆菌感受态细胞,37 ℃培养18 h后,每个转化板挑取5个转化子,进行煮菌PCR验证,最后抽提阳性克隆质粒,DNA测序确认。

1.3 酵母双杂交筛选

根据酵母双杂交系统(ProQuest™ two-hybrid system)操作手册,经过自激活测试后,以pDBLeu-CtBP2为诱饵质粒筛选人肝cDNA文库。超过2×10^6个转化子经过Sd-Trp-Leu-His + 25 mmol/L 3AT的选择平板筛选,获得的克隆经过β-gal半乳糖苷酶底物反应测试后,抽提所得阳性克隆中的prey质粒。将分离到的prey质粒分别与pDBLeu-CtBP2、pDBLeu进行酵母共转化实验,通过营养缺陷平板筛选和β-gal克隆滤膜实验检测报告基因His3、Ura3和LacZ的激活情况,以确定相互作用的特异性。最后对候选prey质粒进行DNA测序和Blast序列比对、分析。

1.4 细胞培养和转染

HeLa细胞用DMEM(含10%胎牛血清)培养液、37 ℃、5% CO_2培养,每2~3天更换新鲜培养液。细胞铺满率达70%以上后,用0.25%胰酶消化,以$(1\sim2)\times10^5$/30 mm培养皿的量接种传代培养。将质粒1~2 μg、Lipofectamine 2000试剂5~7 μl

表1 构建质粒所合成的引物和采用酶切位点

引物名称	引物序列	酶切位点
pDBLeu-CtBP2	正向引物5′-CA**GCTAGC**ATGGCCCTTGTGGATAAG-3′	*Nhe* Ⅰ
	反向引物5′-T**ACTAGT**CTATTGCTCGTTGGGG-3′	*Spe* Ⅰ
pcDNA3.1-His-CtBP2	正向引物5′-CA**GGATCC**GAATGGCCCTTGTGGATAAG-3′	*Bam*H Ⅰ
	反向引物5′-T**CTCGAG**CTATTGCTCGTTGGGG-3′	*Xho* Ⅰ
pEGFP-C1-CtBP2	正向引物5′-CA**AGATCT**ATGGCCCTTGTGGATAAG-3′	*Bgl* Ⅱ
	反向引物5′-T**CTCGAG**CTATTGCTCGTTGGGG-3′	*Xho* Ⅰ/载体用 *Sal* Ⅰ
pPC86-UBE2Ⅰ	正向引物5′-A**GAATTC**ACATGTCGGGGATCGCC-3′	*Eco*R Ⅰ
	反向引物5′-C**AGATCT**TTATGAGGGCGCAAACTTC-3′	*Bgl* Ⅱ
pCMV-Myc-UBE2Ⅰ	正向引物5′-A**GAATTC**ACATGTCGGGGATCGCC-3′	*Eco*R Ⅰ
	反向引物5′-C**AGATCT**TTATGAGGGCGCAAACTTC-3′	*Bgl* Ⅱ
pDsRed-C1-UBE2Ⅰ	正向引物5′-CC**GAATTC**GATGTCGGGGATCGCC-3′	*Eco*R Ⅰ
	反向引物5′-C**AGATC**TTTATGAGGGCGCAAACTTC-3′	*Bgl* Ⅱ/载体用 *Bam*H Ⅰ

加粗部分为酶切位点序列

稀释于 1 ml 细胞培养液 DMEM(不含血清)中,混匀后室温静置 30 min。取新鲜传代并培养过夜的细胞,吸去上清,PBS 清洗 1 次,加入上述混匀的 1 ml 转染液,培养 5 h 后,再加入 1 ml 的 DMEM(含 20% 胎牛血清),继续培养 24 ~ 48 h。

1.5 细胞免疫共沉淀实验

采用上述细胞培养和转染方法,分别共转染细胞表达质粒 pcDNA3. 1-His-hCtBP2 和 pCMV-Myc-UBE2 Ⅰ,同时共转染 pcDNA3. 1-His-hCtBP2 和 pCMV-Myc 作为对照,48 h 后收获细胞。用预冷的 PBS 洗涤 2 次后,加入 1 ml 细胞裂解液 4℃裂解 20 min。取细胞裂解液进行蛋白凝胶电泳,分别用 anti-His 抗体和 anti-Myc 抗体进行 Western blot 实验,检测共转染细胞中 His-CtBP2、Myc-UBE2 Ⅰ的表达情况。取 600 μl 细胞裂解液,加入 15 μl 的 Protein A/G PLUS Agarose,4℃预沉淀 1 h,再加入 1 μg 的 anti-Myc 单克隆抗体进行免疫共沉淀,4 ℃结合过夜。5 000 r/min 离心 2 min,小心去除上清,用裂解液洗涤珠子 3 次,最后用洗脱液洗脱珠子上所吸附的蛋白。取洗脱液进行蛋白凝胶电泳,用 anti-His 单克隆抗体进行 Western blot 检测 His-tag 蛋白免疫共沉淀的情况。

1.6 亚细胞定位和共定位实验

HeLa 细胞培养至铺满率达 70% 以上后,用 0. 25% 胰酶消化,以(1 ~ 2) × 10^5/30 mm 培养皿的量接种,皿内放置预处理的盖玻片进行爬片培养。约 48 h 后,用 Lipofectamine 2000 单独转染 pEGFP-CtBP2、pDsRed-UBE2 Ⅰ荧光融合表达质粒,或者共转染 pEGFP-CtBP2 和 pDsRed-UBE2Ⅰ质粒。转染后 48 h,取出培养皿中的盖玻片,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,取 4% 的中性甲醛固定 20 min。细胞用含 0. 5% Tween20 的 PBS 透化处理 10 min 后,用 1 μg/ml 的 DAPI 进行核染,37 ℃,10 min。漂洗 2 次后,用 90% 甘油缓冲液封片。于 Olympus IX71 荧光显微镜下分别观察绿色、红色荧光蛋白在细胞中的表达和分布情况并拍照,最后对图片进行处理和分析。

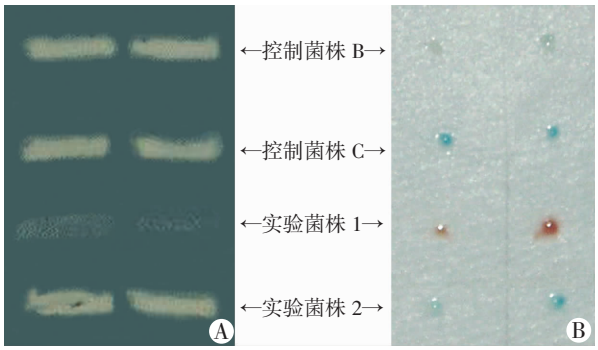
2 结果

2.1 酵母双杂交筛选结果

以人 CtBP2 为诱饵基因,筛选人肝 cDNA 文库超过 2 × 10^6 个克隆,经过酵母共转化实验后,共得到 41 个阳性克隆。抽提其中 prey 质粒测序,对其中的 cDNA 片段进行 Blast 分析发现,这些 cDNA 片段编码 10 个已知蛋白或蛋白片段。这 10 个候选蛋白中既包括一些已知的 CtBP2 相互作用蛋白,如其家族成员 CtBP1、Krüppel 样因子 KLF3(Krüppl-like factor 3),也有一些还未确定的伴侣蛋白,如 Bcl3 (B-cell CLL/lymphoma 3)、PPP1R15A(protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A)、PROX1 (prospero homebox 1)、Casp8AP2(caspase 8 associated protein 2)等。在 41 个阳性克隆中,有 4 个克隆编码同一蛋白,即泛素结合酶 UBE2 Ⅰ(ubiquitin-conjugating enzyme E2 Ⅰ)的不同片段,其中最长的缺失了完整编码序列 5′端 21 bp,即编码一个缺失了 N 端 7 个氨基酸的 UBE2 Ⅰ蛋白片段。

2.2 酵母共转化实验证实 CtBP2 与全长 UBE2 Ⅰ之间的相互作用

从人肝 cDNA 文库中 PCR 扩增 UBE2 Ⅰ基因的全长编码序列,并克隆到 pPC86 载体上,DNA 测序表明成功获得了 UBE2 Ⅰ全长编码序列,共 477 bp。分别将质粒 pPC86-UBE2 Ⅰ与 pDBLeu-CtBP2、pPC86-UBE2 Ⅰ与 pDBLeu 共转化酵母 Mav203,在 Sd-TL 平板培养获得转化子,分别挑选 2 个转化子检测报告基因 His3、Ura3 和 LacZ 的表达情况,实验中以 ProQuest™ two-hybrid system 提供的控制菌株 B、C 分别作为弱相互作用、中等相互作用的阳性对照。图 1A 显示,转化子接种到 Sd-Trp-Leu-His-Ura + 25 mmol/L 3AT 平板上后,共转化了 Bd-CtBP2 与 Ad-UBE2 Ⅰ的酵母激活了报告基因 His3 和 Ura3,因此菌株能够生长;而共转化了 BD 载体与 Ad-UBE2 Ⅰ的酵母不能激活 His3 和 Ura3,不能在选择平板上生长。同时转化子影印到滤纸上,以 β-gal 为底物检测报告基因 LacZ 的表达情况,结果见图 1B。共转化了 Bd-CtBP2 与 Ad-UBE2 Ⅰ的酵母菌激活了报告基因 LacZ,因此其产物 β-gal 半乳糖苷酶与底物反应后显示蓝色;而共转化了 BD 载体与 Ad-UBE2 Ⅰ的酵母不能激活 LacZ,没有 β-gal 半乳糖苷酶,不能与底物发生颜色反应。结合自激活实验和酵母共转化实验结果,表明 CtBP2 与 UBE2 Ⅰ共转化后才能够激活所有报告基因,而单独 CtBP2 或者 UBE2 Ⅰ均不能。酵母共转化实验证实了 CtBP2 与全长 UBE2 Ⅰ之间能够发生特异性的相互作用。



控制菌株 B:代表弱相互作用;控制菌株 C:代表中等强度相互作用;实验菌株 1:共转化 BD 和 Ad-UBE2 Ⅰ质粒的菌株;实验菌株 2:共转化 Bd-CtBP2 和 Ad-UBE2 Ⅰ质粒的菌株

A:营养缺陷平板培养检测报告基因 His3 和 Ura3 的表达;B:克隆滤膜实验检测报告基因 LacZ 的表达

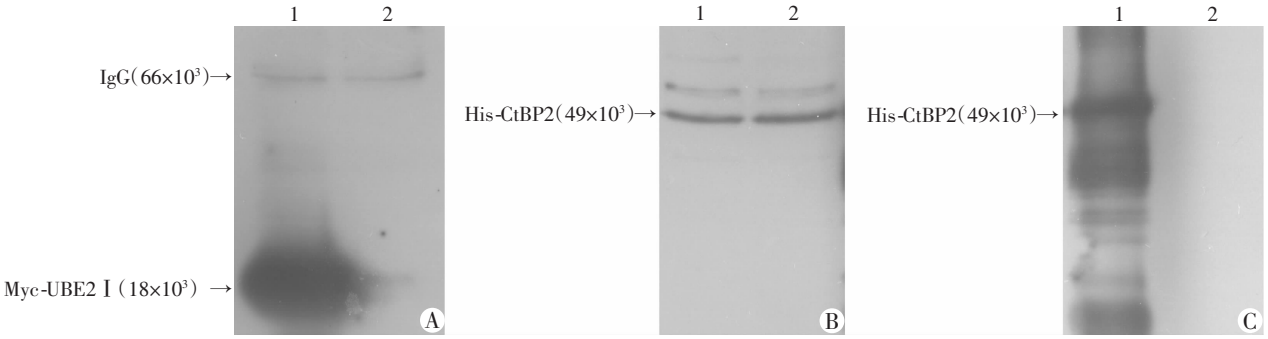
图 1 酵母共转化实验验证 CtBP 与全长 UBE2 Ⅰ之间的相互作用

2.3 细胞免疫共沉淀实验确认 CtBP2 与 UBE2 Ⅰ在细胞内的相互作用

为了研究 CtBP2 与 UBE2 Ⅰ在哺乳动物细胞内的相互作用情况,构建了哺乳动物细胞表达质粒 pcDNA3. 1-His-CtBP2 和 pCMV-Myc-UBE2Ⅰ,共同瞬时转染 HeLa 细胞,同时将 pcDNA3. 1-His-CtBP2 和 pCMV-Myc 载体共转染 Hela 细胞作为对照。分别以 Myc 抗体(图 2A)和 His 抗体(图 2B)Western blot 检测共转染后细胞中 His-CtBP2 和 Myc-UBE2 Ⅰ的表达情况,结果表明 2 个蛋白在细胞内共表达,His-CtBP2 约 49 × 10^3,Myc-UBE2 Ⅰ约 18 × 10^3。取共转染的细胞裂解液以 Myc 抗体进行免疫共沉淀、His 抗体进行 Western blot 检测沉淀物中的蛋白成分,结果表明:Myc-UBE2 Ⅰ能够与 His-CtBP2 结合形成复合物,因此在沉淀物中检测到 His-CtBP2(图 2C);而对照共转染细胞中单独 Myc 不能与 His-CtBP2 结合,共沉淀产物中没有检测到 His-CtBP2。细胞免疫共沉淀实验证实了 CtBP2 与 UBE2 Ⅰ能够在哺乳动物细胞内特异性相互作用,形成蛋白复合物。

2.4 CtBP2与UBE2Ⅰ在HeLa细胞中的共定位

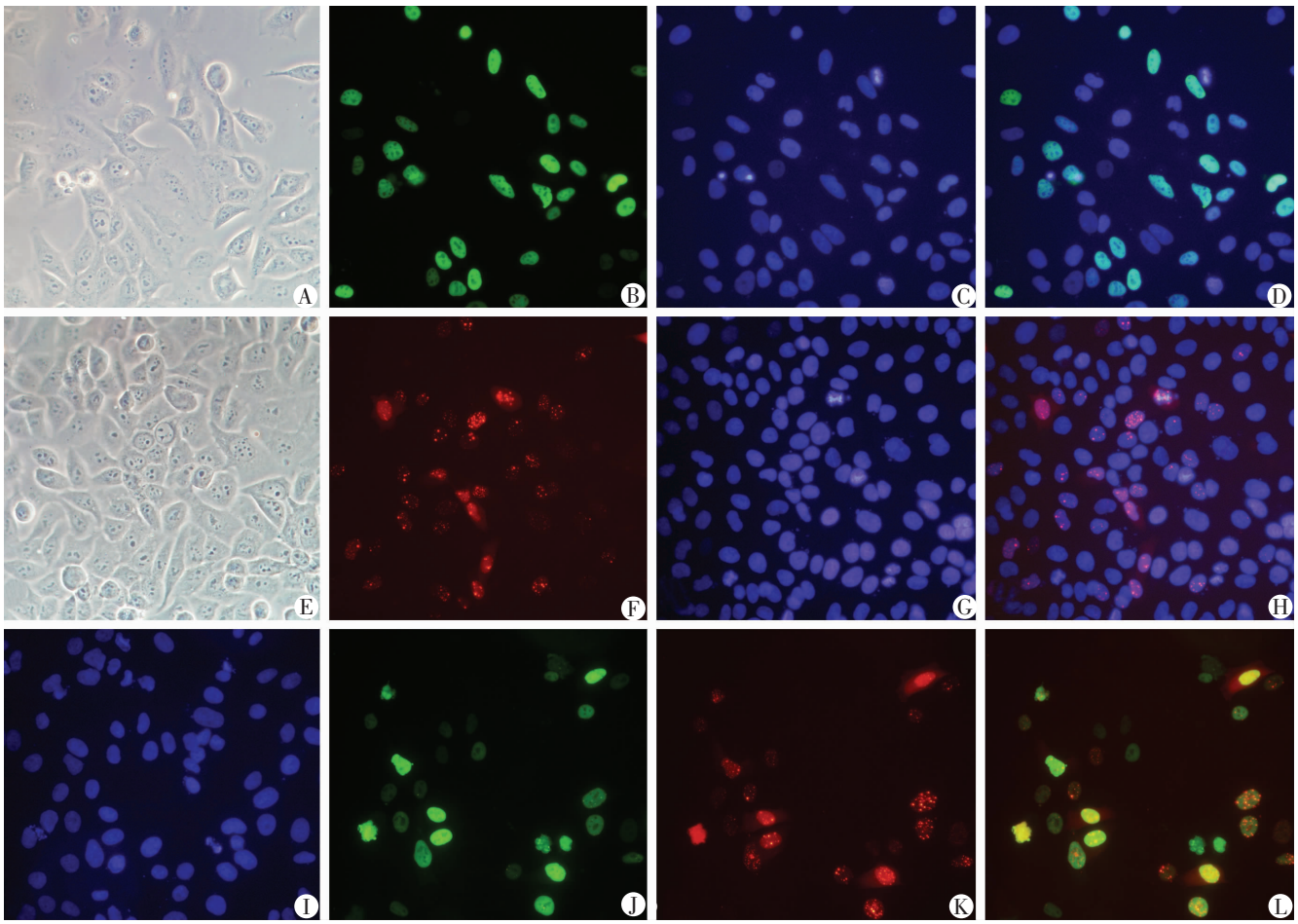
爬片培养HeLa细胞，分别单独转染pEFGP-CtBP2或者pDsRed-UBE2Ⅰ，48 h后DAPI核染，于荧光显微镜下观察。通过观察和结果分析表明，GFP-MIP绿色荧光蛋白均匀弥散分布于细胞核中（图3A～D）；DsRed-UBE2Ⅰ红色荧光蛋白也分布于细胞核中，但是呈显著的点状、不均匀分布（图3E～H）。然后pEFGP-CtBP2、pDsRed-UBE2Ⅰ共转染HeLa细胞，DAPI核染后荧光显微镜观察：共转染时两者能够在细胞内共表达，此时GFP-MIP（图3J）和DsRed-UBE2Ⅰ（图3K）的亚细胞定位情况都没有大的改变，仍然分布于细胞核内；图像重叠分析显示，此时GFP-CtBP2和DsRed-UBE2Ⅰ能够共定位于细胞核，尤其是核内某些点状聚集区（图3L，黄色）。亚细胞共定位实验证实CtBP2能够与UBE2Ⅰ在细胞核内发生相互作用。



1：pcDNA3.1-His-CtBP2和pCMV-Myc-UBE2Ⅰ共转染；2：pcDNA3.1-His-CtBP2和pCMV-Myc载体共转染

A：使用Myc抗体Western blot检测共转染细胞中带Myc标签的融合蛋白的表达；B：使用His抗体Western blot检测共转染细胞中His-CtBP2的表达；C：采用Myc抗体免疫沉淀、His抗体Western blot检测His-CtBP2的免疫共沉淀

图2 细胞免疫共沉淀实验确认CtBP2与UBE2Ⅰ在细胞内的相互作用



A～D：单独转染时GFP-CtBP2（绿色）在HeLa细胞中的亚细胞定位情况；E～H：单独转染时DsRed-UBE2Ⅰ（红色）在HeLa细胞中的亚细胞定位情况；I～L：共转染时GFP-CtBP2（绿色）与DsRed-UBE2Ⅰ（红色）在HeLa细胞中的亚细胞共定位情况（黄色）。A、E：明视野观察细胞形态；B、F、J、K：荧光融合蛋白分布情况（绿色或者红色）；C、G、I：细胞核的位置和形态（DAPI核染，蓝色）；D、H、L：重叠分析

图3 荧光融合蛋白示踪研究确定CtBP2与UBE2Ⅰ在HeLa细胞中共定位

3 讨论

泛素化和小泛素相关修饰物(small ubiquitin-related modifier,SUMO)化是蛋白质翻译后修饰的重要方式,广泛参与调节蛋白质功能和细胞生命活动各个环节。UBE2Ⅰ是泛素化和SUMO化修饰中的一个重要因子。它既可作为泛素结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme E2)对底物进行泛素化修饰,也可作为SUMO中的偶联酶(sumo-conjugating E2)对底物进行SUMO化修饰。因此UBE2I连接靶蛋白后,可通过泛素化或者SUMO化,从调节蛋白水平或者稳定性及与其他生物大分子的相互作用等多个方面影响靶蛋白的活性和功能。目前已经发现大量的UBE2Ⅰ靶蛋白,包括p53、GATA4等重要的转录因子和NFκB抑制因子IκBα、增殖细胞核抗原PCNA等许多重要的蛋白因子[13-16],从而广泛参与核质运输、亚细胞定位、染色质构象、DNA修复、基因表达、细胞增殖和凋亡等多种过程。

作为CtBP蛋白家族成员之一,目前对于CtBP2的研究还比较少。本研究发现并证实人CtBP2可以在细胞核内与UBE2Ⅰ特异性相互作用,确认了CtBP2是一个新的UBE2Ⅰ靶蛋白,为深入研究CtBP2的生物学功能提供了重要基础。作为UBE2Ⅰ的靶蛋白,CtBP2与UBE2Ⅰ相互作用后,可根据需要选择进行泛素化或者SUMO化修饰。选择泛素化可降解CtBP2,从而调节其蛋白水平;选择SUMO化可调节CtBP2的蛋白构象,改变与其他蛋白的结合能力。由于修饰过程的可逆性,泛素化和SUMO化都是非常有效的调控机制。而且由于SUMO和泛素结合底物的位点都是赖氨酸残基,在不同情况下,两者既可协同调节蛋白质功能,也可相互竞争和拮抗。首先SUMO化和泛素化可通过不同的修饰位点产生拮抗效应,例如p53通过不同的氨基酸位点泛素化和SUMO化,泛素修饰使p53蛋白降解,SUMO修饰则通过改变其空间构象、在细胞内的分布、阻止泛素连接酶催化p53的泛素化、影响p53的乙酰化修饰等,增强其转录活性,2种修饰效应相互拮抗[13]。SUMO化和泛素化也可以通过不同的修饰位点产生协同效应,如NF-κB信号通路中激酶复合物IKK的调节亚基NEMO,其K277和K309都是SUMO和泛素结合位点,两者协同有序地调节NEMO的定位和活性,激活IKK,进而激活化NF-κB信号通路[14]。另外,SUMO化和泛素化还可通过相同的修饰位点产生竞争效应,例如NF-κB抑制因子IκBα的K21[15]、PCNA蛋白的K164[16],都既可被泛素蛋白修饰,也可被SUMO蛋白修饰,因此这两种修饰途径之间就存在竞争效应,可竞争调节蛋白活性。最近还有研究发现,某些底物的SUMO化能够激活体内一类新的SUMO依赖的泛素连接酶RNF4,进而启动泛素-蛋白酶体途径降解底物[17]。上述这些机制导致了蛋白质SUMO化和泛素化关系的精细化和复杂化。因此,CtBP2与UBE2Ⅰ相互作用后,可通过CtBP2蛋白上的某些氨基酸位点选择进行泛素化或者SUMO化,通过这两种翻译后水平的修饰,竞争或协同调节CtBP2的蛋白水平和生物学功能。

通过与UBE2Ⅰ的相互作用,CtBP2选择进行一定蛋白修饰后,最终可能影响和调节CtBP2的表达和生物学功能。一方面,可根据特定的时间或者空间差异,选择泛素化或者SUMO化修饰CtBP2,竞争或协同调节其蛋白水平,从而实现CtBP2在胚胎发育的特定时间或空间的不同表达状态,以及在不同时空的转录调节活性。另一方面CtBP2作为CtBP家族一员,传统研究认为其主要功能是转录辅助抑制因子,已有大量研究表明一些转录因子通过募集CtBP蛋白实现对靶基因的转录抑制,如KLF3(Krüpple-like factor 3)、Znf217等。但是也有研究显示CtBP2可能作为转录激活因子调节某些靶基因的转录,其具体机制还不清楚[10]。而CtBP2与UBE2Ⅰ的相互作用,使得CtBP2可根据情况通过SUMO化修饰改变其蛋白构象,从而调节CtBP2与某些特定转录因子的结合能力,进而实现其转录抑制或者转录激活功能的转换,这为将来深入研究阐明CtBP2与CtBP1不同的生物学功能提供了重要线索。

作为一个中间媒介,CtBP2与UBE2Ⅰ的相互作用将CtBP2与泛素化、SUMO化这两个重要的蛋白修饰途径联系起来。什么时候,哪些信号决定CtBP2泛素化还是SUMO化修饰,从而影响其表达水平或者与之结合的转录因子,进而激活或抑制某些靶基因的转录,这些问题都有待将来进一步的深入研究。

参考文献:

[1] Schaeper U, Boyd J M, Verma S, *et al*. Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(23): 10467-10471.

[2] Chinnadurai G. CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis[J]. Mol Cell, 2002, 9(2): 213-224.

[3] Chinnadurai G. The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors[J]. Cancer Res, 2009, 69(3): 731-734.

[4] Chinnadurai G. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(9): 1593-1607.

[5] Shi Y, Sawada J, Sui G, *et al*. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex[J]. Nature, 2003, 422(6933): 735-738.

[6] Corda D, Colanzi A, Luini A. The multiple activities of CtBP/BARs proteins: the Golgi view[J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(3): 167-173.

[7] Spyer M, Allday M J. The transcriptional co-repressor C-terminal binding protein (CtBP) associates with centrosomes during mitosis[J]. Cell Cycle, 2006, 5(5): 530-537.

[8] Zhao L J, Subramanian T, Zhou Y, *et al*. Acetylation by p300 regulates nuclear localization and function of the transcriptional corepressor CtBP2[J]. J Biol Chem, 2006, 281(7): 4183-4189.
[9] tom-Dieck S, Altrock W D, Kessels M M, *et al*. Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex[J]. J Cell Biol, 2005, 168(5): 825-836.
[10] Hildebrand J D, Soriano P. Overlapping and unique roles for C-terminal binding protein 1 (CtBP1) and CtBP2 during mouse development [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(15): 5296-5307.
[11] Furusawa T, Moribe H, Kondoh H, *et al*. Identification of CtBP1 and CtBP2 as corepressors of zinc finger-homeodomain factor deltaEF1 [J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(12): 8581-8590.
[12] Van-Hateren N, Shenton T, Borycki A G. Expression of avian C-terminal binding proteins (Ctbp1 and Ctbp2) during embryonic development[J]. Dev Dyn, 2006, 235(2): 490-495.
[13] Jiang M, Chiu S Y, Hsu W. SUMO-specific protease 2 in Mdm2-mediated regulation of p53[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(6): 1005-1015.
[14] Huang T T, Wuerzberger-Davis S M, Wu Z H, *et al*. Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress [J]. Cell, 2003, 115(5): 565-576.
[15] Liu Q, Li J, Khoury J, *et al*. Adenosine signaling mediates SUMO-1 modification of IkappaBalpha during hypoxia and reoxygenation[J]. J Biol Chem, 2009, 284(20): 13686-13695.
[16] Bergink S, Jentsch S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair[J]. Nature, 2009, 458(7237): 461-467.
[17] Percherancier Y, Germain-Desprez D, Galisson F, *et al*. Role of SUMO in RNF4-mediated promyelocytic leukemia protein(PML) degradation: sumoylation of PML and phospho-switch control of its SUMO binding domain dissected in living cells[J]. J Biol Chem, 2009, 284(24): 16595-16608.

(**收稿**:2011-03-15;**修回**:2011-05-16)
(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2011)17-1788-01

母亲 t(3;20)易位生育 20p 部分三体 1 例

申跃武,蔡晓明,曾 梅,梁素华,陈保锋,宋桂芹 (637100 四川 南充,川北医学院医学生物学教研室)

[**关键词**] 染色体平衡易位;20p 部分三体;遗传咨询
[**中图法分类号**] R596.1 [**文献标志码**] B

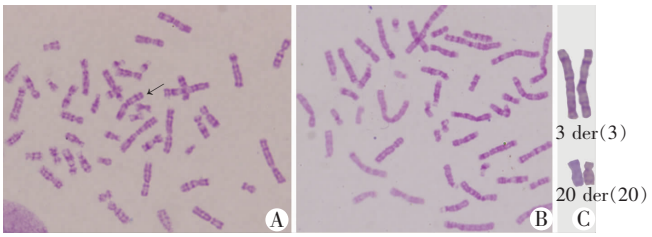
涉及 F 组染色体的异常较为少见。20p 三体患儿出生前后生长基本正常,无相关疾患,往往因走路和语言发育推迟而引起大人注意[1]。主要症状有:精神发育迟滞,生长正常,特征性的圆脸,运动协调性差,语言能力差。由父母平衡易位引起 20p 三体同时伴有相关染色体缺失,或相关基因的干扰,而出现其他异常。2010 年我们发现 1 例,报告如下。

1 临床资料

1 对夫妇因生育 1 个智力低下及生长发育迟缓的女孩,于 2010 年 1 月到我院进行遗传咨询。该夫妇表型正常,非近亲婚配,否认家族流产史。丈夫 31 岁,妻子 24 岁时第 1 胎足月顺产 1 女,就诊时其女儿 2 岁零 9 个月,不会叫爸妈,不会走路,四方脸,深位眼,眼睛斜视,牙齿细小,齿间距大。外阴正常,体质量身高正常,家人描述其食欲很好。核型分析结果显示:患儿父亲核型正常,母亲为 46,XX,t(3;20)(p27;p11)(图 1),其女儿核型为 46,XX,der(3)t(3;20)(p27;p11)mat,临床诊断:20p 部分三体。患儿母亲有一表型正常的弟弟,外祖父母表型正常,拒绝染色体检查。

2 讨论

本例 20p 易位于 3p 末端,对照 3p 缺失综合征的症状:发育延迟,产后生长阻滞,低出生体质量,上睑下垂,畸形耳,长人中等[2],本例与之几乎没有任何相似症状。本例与 3 号环状染色体比较,语言发育滞后相似[3],但 20p 三体发生语言发育滞后比例为 21/22,20p 易位于 3 号以外的染色体几乎都有语言发育滞后,且染色体异常的症状重合非常多见,故本例 3 号染色体对症状影响很小,46,XX,der(3)t(3;20)(p27;p11)被视为 20p 三体典型核型[4]。本例与 Archidiacono 等[5]报道病例核型相同,该例伴有心脏异常,并将精神发育迟滞归因于心脏异常,缺少运动和环境刺激,Sidewell 等[6]总结心脏异常比例为 10/28,而精神发育迟滞比例高达 29/31,可见心脏问题并不是很多病例精神发育迟滞的主要原因。



A:女儿核型,箭头示 der(3);B:母亲核型;C:母亲部分核型

图 1 20p 部分三体女儿和 t(3;20)母亲 G 带核型结果

大多数 20p 三体病例由父母的平衡易位所引起[7],个别病例因父母倒位引起[8],也有的为新发生[1]。平衡易位携带者的生育情况受到学者关注,Stengel-Rutkowski 曾收集病例,计算出 20pter→p11.1-p11.2 携带者发生相邻一分离,生育非平衡活产儿风险为 20%[9]。我们对已报道的出生了 20p 三体的 4 个家系[5,10-11]连同本例中的平衡易位携带者的生育情况进行了

(下转 1797 页)

[**通信作者**] 梁素华,电话:(0817)3352044,E-mail:sh_liang_@163.com